

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：38005

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26892028

研究課題名(和文) エボラウイルスの転写・複製制御機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of Ebola viral transcription and replication

研究代表者

杉田 征彦(杉田征彦)(Yukihiko, Sugita)

沖縄科学技術大学院大学・その他の研究科・研究員

研究者番号：00734469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：エボラウイルスゲノムの転写・複製制御機構の分子基盤を解明する目的で、クライオ電子顕微鏡を用いたエボラウイルスNP-RNA複合体(NP helix)の構造解析を行った。NP helixのクライオ電子顕微鏡画像を大量撮影し、コンピュータークラスタを用いて画像解析した結果、近原子分解能で詳細な三次元構造モデルを構築した。NP helix上では、隣合うNPが密に結合していた。また、C末端のヘリックスはジッパーのように特徴的に並ぶ構造を有することが判った。これらの構造は、NP helixの形態形成およびウイルス感染環における構造変化のメカニズムを説明するための重要な知見となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to further understanding of structural basis of Ebola viral transcription and replication by an cryo-electron microscopic analysis of the viral nucleocapsid core, nucleoprotein-RNA complex (NP helix). The reconstructed three-dimensional structure of the NP helix shows that it is formed by a helical assembly of a band of tightly packed NP units. The clearly resolved alpha-helical structures of NP C-terminus are located at the seam between the axial boundaries of the protein band. The structure suggests both a mechanism of self-assembly and reversible structural change of the NP helix during the Ebola viral life cycle.

研究分野：ウイルス学

キーワード：エボラウイルス クライオ電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

エボラウイルスは、ヒトを含む霊長類に対して重篤な急性感染症を引き起こし、その致死率は90%に達することもある。エボラウイルスによる感染・死亡例は中央および西アフリカにおいて散発的にみられるが、近年その報告数が増加している。2014年には、史上最大規模のアウトブレイクが西アフリカで勃発し、それに伴う欧米諸国への輸入例も散発した。この事例からも、短期間の風土病に留まっていた本病が長期化・グローバル化する現状があらわになった。従って、エボラウイルス病への早急な対策が求められているが、感染性ウイルスを用いた研究にはバイオセーフティレベル4施設が必要であるという制約もあり、いまだ有効な予防および治療法が確立されていない。

フィロウイルス科に属するエボラウイルスはマイナス一本鎖RNAをゲノムとして持つヒモ状のエンベロープウイルスである。ゲノムRNAは多数のウイルス核蛋白質(NP)に結合して螺旋構造をとり、さらにウイルス蛋白質VP24とVP35がNPに結合して成熟ヌクレオキャプシドを形成する。VP24は、成熟ヌクレオキャプシドの形成に必須の分子である一方で、NPとの結合依存的にゲノムRNAの転写・複製を抑制する(Watanabe et al, J Infect Dis, 2007)。これまでも、ウイルスのヌクレオキャプシドの構造解析が行われている(Bharat et al., PNAS, 2012)。しかし、ヌクレオキャプシド上でゲノムRNAがどのようにNPに結合するか、NP同士がどのように結合して高次の螺旋構造(NP helix)を形成するか、その他の構成蛋白質(VP24, VP35)がどのようにヌクレオキャプシドに結合するか等、ウイルスゲノムの転写・複製制御機構を説明する上で重要であるヌクレオキャプシドの詳細な分子構造は不明だった。

2. 研究の目的

クライオ電子顕微鏡を用いてエボラウイルスのヌクレオキャプシドを高分解能で明らかにし、ウイルスゲノムの転写・複製制御機構の分子基盤を解明する。

3. 研究の方法

(1) NP helix およびヌクレオキャプシドの精製

ヒト胎児由来腎臓上皮細胞 HEK293T 細胞で、C末端領域を欠損させたNPを強制発現した。強制発現細胞質内でNPとRNAが結合し、形成されたNP helixを細胞溶解によって溶出させた後、塩化セシウム密度勾配遠心法を用いて精製した。

HEK293T細胞内においてNP、VP24およびVP35を強制発現し、細胞内で形成されたヌクレオキャプシドをNP helixと同様の方法で精製した。精製した蛋白質の精製度および構造を、ネガティブ染色法で確認した。

(2) 氷包埋法

蛋白質複合体のネイティブな構造を保持したまま観察するために、最適な蛋白質濃度および急速凍結条件を検討した上で、非晶質の氷中にNP helixを固定した。

(4) クライオ電子顕微鏡法

凍結された試料の低温を保ったまま、クライオ透過型電子顕微鏡および電子直接検出型カメラを用いて、NP helixの二次元透過像を大量に取得した。

(3) 螺旋再構成法を用いたNP helixの三次元分子構造の解析

ソフトウェアEMAN2を用いて、撮影した二次元透過像内のNP helix画像を切り出した。さらに、ソフトウェアSPRINGを用いて画像の分割、整列および分類を行い、同じグループに分類された画像を平均化して信号雑音比を向上させた。平均化像と、計算機によって推定された構造パラメータを用いて、NP helixの三次元像を再構成した。

4. 研究成果

(1) NP helix およびヌクレオキャプシドの精製

螺旋構造を保持したNP helixが精製された(図1)。ヌクレオキャプシドは細胞溶解あるいは精製の過程で螺旋構造が緩んで変形し、その後の構造解析を困難にしている。そのため、以降本研究期間においてはNP helixの解析を優先して行った。

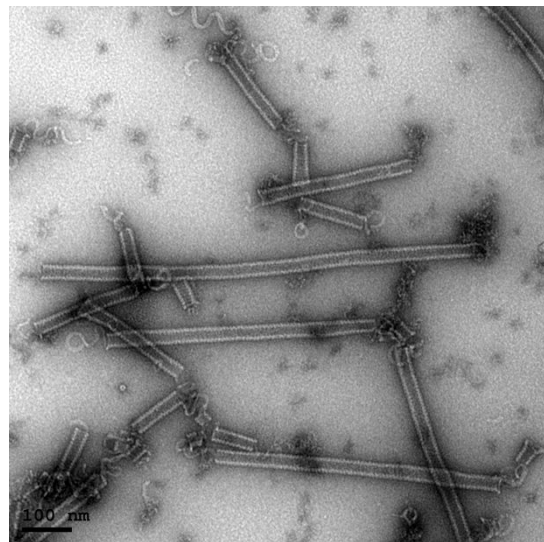


図1. NP helixのネガティブ染色像

(2) 氷包埋法の最適化およびクライオ電子顕微鏡法

厚い氷の中に試料を包埋すると、氷自体が雑音を生じ、画像の信号雑音比が著しく悪くなって高分解能の構造情報を取り出すことが困難になる。しかしながら、研究を進める過程で、氷が薄すぎるとNP helixの螺旋構造を変形させてしまうことが明らかになった。条件検討の結果、NP helixの構造を保

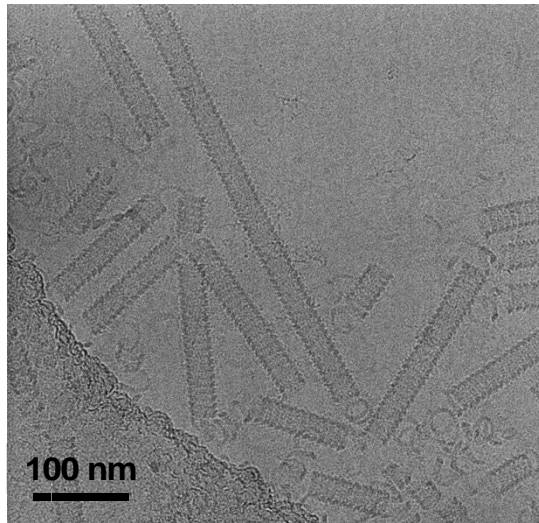


図2. NP helixのクライオ電子顕微鏡像

ちつつ、薄い氷を作る凍結条件を見出した(図2)

(3) SPRING を用いた 画像解析の結果、4.7 オングストロームの近原子分解能で NP helix の構造モデルを構築することが出来た (図3)。隣合う NP 分子 は互いに密に結合し、螺旋構造を形成する事が判った。また、NP 分子の C 末端には比較的長い2個の ヘリックスが螺旋の外側に向けて放射状に配置されていることが判った。これは近縁の RNA ウィルスには見られない、エボラウィルスのヌクレオキャプシドに特異な構造である。さらに、それらの ヘリックスの上部と、螺旋軸方向に隣り合う NP の N 末端とを繋ぐ領域に電子密度が観察された。これは、ヌクレオキャプシドの形成時や転写・複製反応の際に起きる NP helix の可逆的な構造変化時に働く鎖間の結合領域と考えられる。本研究によって明らかにされた NP helix 構造は、ヌクレオキャプシドの形態形成および、その担う転写・複製反応時における構造変化機構を明らかにするための重要な知見となると考えられる。また、本研究によって確立された構造解析の手法は、NP helix を基本構造とするヌクレオキャプシドの構造解析にも応用できると考えられる。

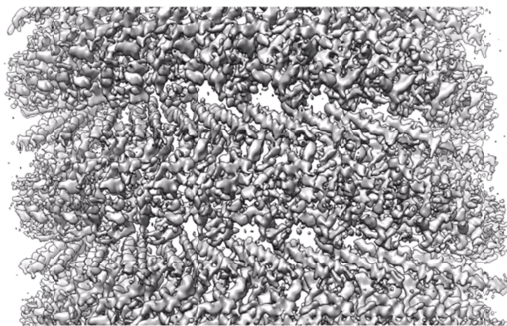


図3. NP helixの三次元構造モデル

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4件)

Sugita Y, Kawaoka Y, Noda T, Wolf M. Structure of the Ebola virus Nucleocapsid Core by Single Particle Cryo-Electron Microscopy. *Microscopy & Microanalysis 2016 Meeting*. 2016. 0741-000554. *in press* (査読有)

Abe Y, Tamura T, Torii S, Wakamori S, Nagai M, Mitsuhashi K, Mine J, Fujimoto Y, Nagashima N, Yoshino F, Sugita Y, Nomura T, Okamoto M, Kida H, Sakoda Y. Genetic and antigenic characterization of bovine viral diarrhoea viruses isolated from cattle in Hokkaido, Japan. *J Vet Med Sci*. 2016 Feb 1;78(1):61-70. Epub 2015 Sep 21. (査読有)

Koga R, Sugita Y, Noda T, Yanagi Y, Ohno S. Actin-Modulating Protein Cofilin Is Involved in the Formation of Measles Virus Ribonucleoprotein Complex at the Perinuclear Region. *J Virol*. 2015 Oct 15; 89(20):10524-10531. Epub 2015 Aug 12. (査読有)

Watanabe T, Kawakami E, Shoemaker JE, Lopes TJS, Matsuoka Y, Tomita Y, Kozuka-Hata H, Gorai T, Kuwahara T, Takeda E, Nagata A, Takano R, Kiso M, Yamashita M, Sakai-Tagawa Y, Katsura H, Nonaka N, Fujii H, Fujii K, Sugita Y, Noda T, Goto H, Fukuyama S, Watanabe S, Neumann G, Oyama M, Kitano H, Kawaoka Y. Influenza Virus-Host Interactome Screen as a Platform for Antiviral Drug Development. *Cell Host Microbe*. 2014 Dec 10;16(6):795-805. Epub 2014 Nov 20. (査読有)

[学会発表](計 9件)

Sugita Y, Kawaoka Y, Noda T, Wolf M, Cryo-electron tomographic analysis of influenza viral transcription, Three Dimensional Electron Microscopy Gordon Research Conference. 2016 June 19-24. Hong Kong, China

杉田征彦、河岡義裕、野田岳志、Matthias Wolf、エボラウィルス NP helix のクライオ電子顕微鏡解析、5th Negative Strand Virus-Japan symposium、2016年1月26日、ホテルモントレ沖縄、沖縄県・恩納村

Nakano M, Sugita Y, Shindo K, Wolf M, Noda T. Ultrastructural analysis of influenza virus genome transcription, JST CREST-PRESTO joint international symposium, 2015 Nov 5,

Tokyo, Japan

Sugita Y, Kawaoka Y, Noda T, Wolf M,
Cryo-electron microscopic analysis of
influenza virus ribonucleoprotein
complex during transcription, East
Asia Joint Symposium 2015, 2015 Nov
13-14. Okinawa, Japan.

杉田 征彦、Cryo-electron microscopic
analysis of Ebola viral nucleocapsid. 4th
Negative Strand Virus-Japan
symposium、

6 . 研究組織

(1)研究代表者

杉田 征彦 (SUGITA, Yuihiko)

沖縄科学技術大学院大学・生体分子顕微鏡解

析ユニット・博士研究員

研究者番号：00734469